

Protein domain screening system for structural genomics

○Eiko Seki¹, Takanori Kigawa^{1,2}, Natsuko Matsuda¹, Yoshihide Hayashizaki³, Shigeyuki Yokoyama^{1,2,4}

¹*Protein Research G., GSC, RIKEN Yokohama Institute, ²Cell Signal Lab., RIKEN Harima Institute at Spring-8, ³Genome Exploration Research G., GSC, RIKEN Yokohama Institute, ⁴Grad. Sch. of Sci., Univ. of Tokyo*

In RIKEN GSC Protein Research Group, we are heading for the systematical determination of the three-dimensional structures of protein folds. For this purpose, it is essential to prepare soluble and properly folded protein samples for structural analyses.

Here, we constructed a new experimental system, which enables us to select suitable samples for structural analyses. To begin with, target cDNA was randomly fragmented with Exonuclease III, to construct a deletion library of various lengths. For the 1st step screening, deleted fragments were expressed as C-terminal GFP-fusions in *E.coli*, and fluorescing clones were selected as candidates. For the 2nd step screening, those selected clones were expressed in cell free synthesis system, and screened on the basis of the intensity of GFP fluorescence.

We verified this screening system with mouse growth factor receptor-binding protein 2 (Grb2). The GFP fluorescence in the 2nd step screening was correlated with the solubility of deleted fragments. The terminals of soluble fragments coincided with the structural boundaries of Grb2. Thus, by using this system, we could screen protein samples for structural analyses, from the pool of various proteins. We are now applying this system to define structural domains of mouse cDNA.

序論

構造ゲノム科学は、タンパク質の立体構造解析を系統的かつ網羅的に行うものである。数万個といわれるタンパク質の立体構造は、数千種類の基本構造の組み合わせから形成されていると考えられており、我々はタンパク質の基本構造を網羅的に解明することにより、タンパク質の立体構造の全貌を明らかにしようとしている。この目的のためには、NMRやX線結晶構造解析を用いた立体構造解析に適した、構造をとり、かつ可溶性の高いタンパク質試料を、迅速に選び出す系の構築が重要である。

Waldo(1999)らの報告によると、タンパク質のC末端側にGFPを融合させた状態で大腸菌内で発現させることにより、その可溶性を検出することが可能である。しかしながら、大腸菌内で発現したタンパク質の蛍光強度を測定することは、煩雑であり、多検体同時処理に向いているとはいえない。そこで、我々は、cDNA deletion libraryのGFP-fusionと無細胞タンパク質合成系を組み合わせることにより、より正確かつ簡便に、可溶性のタンパク質ドメインを選び出す系の構築を行った。

タンパク質ドメイン選択法の開発

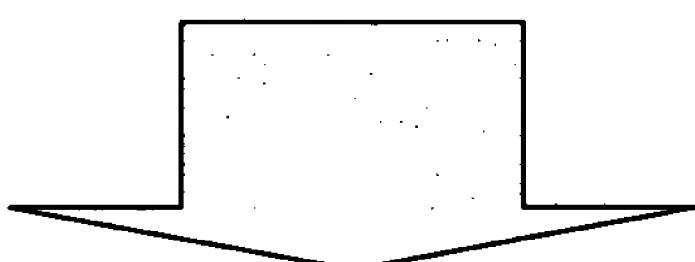
- 実験的タンパク質ドメイン選択法の必要性
 - 立体構造解析において、構造をとり、かつ可溶なタンパク質試料が必要である。
 - タンパク質の可溶性は、一次配列上からは予測出来ず、実験的手法でしか確認できない。
 - 構造ゲノム科学では多検体同時処理による構造決定が必要である。
- 必須条件
 - 簡便かつ迅速な方法
 - 立体構造をとったドメインの選択
 - 可溶性ドメインの選択
 - 大量合成系への簡便な移行

GFP融合体を利用した 可溶性サンプルのスクリーニング

GFP 融合体:

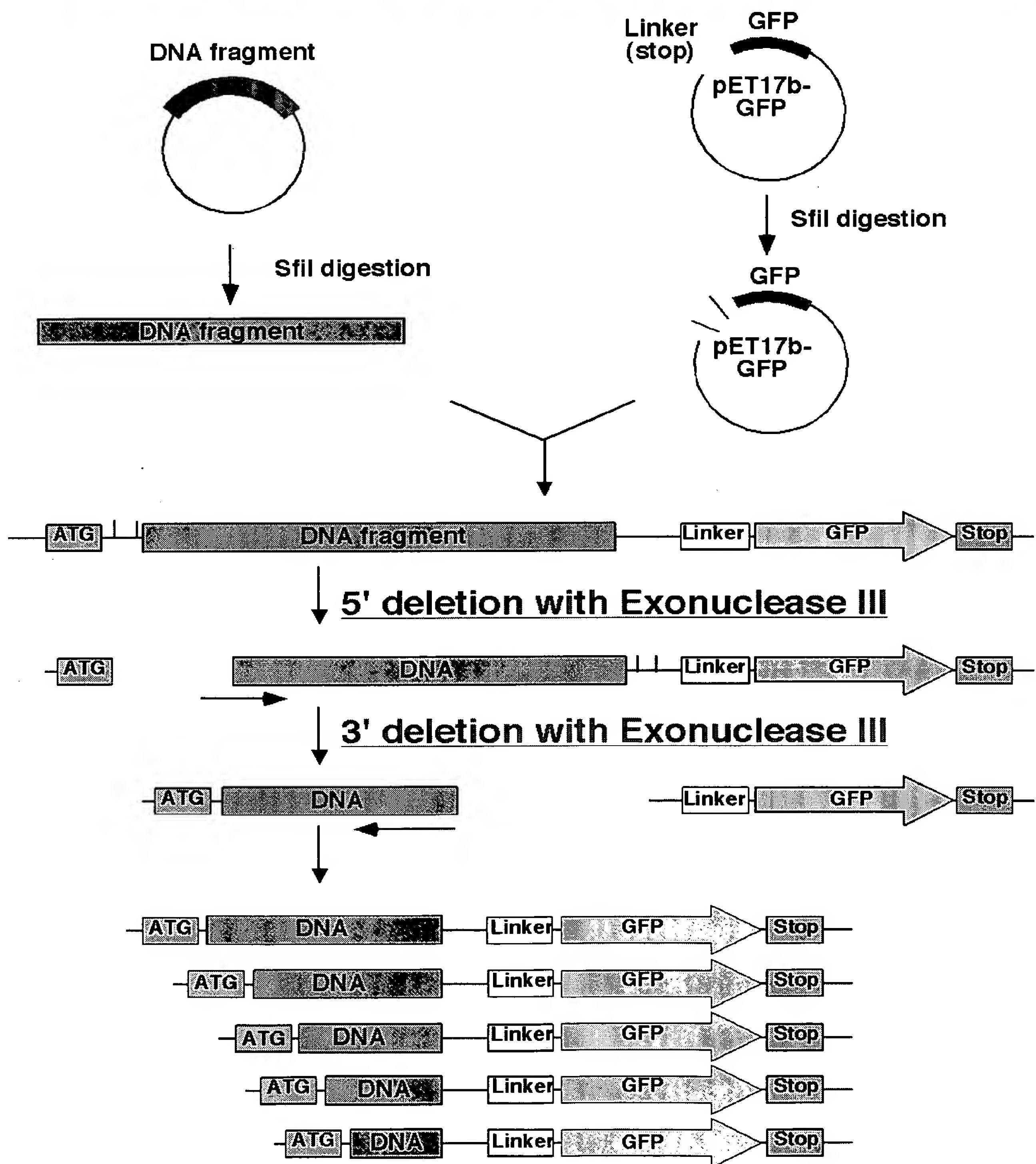
可溶性タンパク質をC末端側でGFP融合体にすると発光する
↔ 難溶性タンパク質は発光しない

(Waldo G S et al Nat Biotechnol 17, 691-695 (1999))



様々な長さを含む均質で良質なdeletion libraryと組み合わせることで、効率よく構造解析に適したタンパク質ドメインをスクリーニングできる

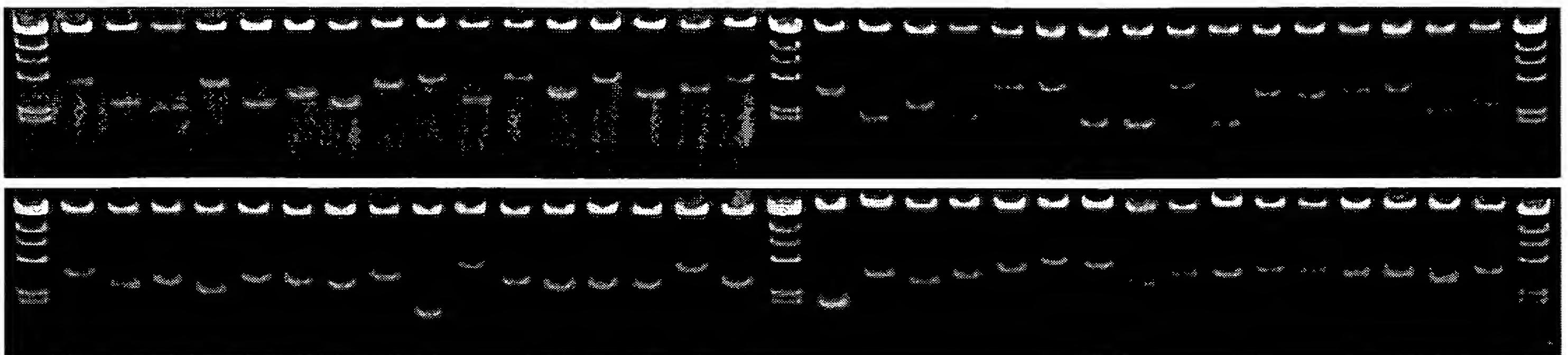
Exonuclease IIIを用いた Deletion Libraryの作成方法



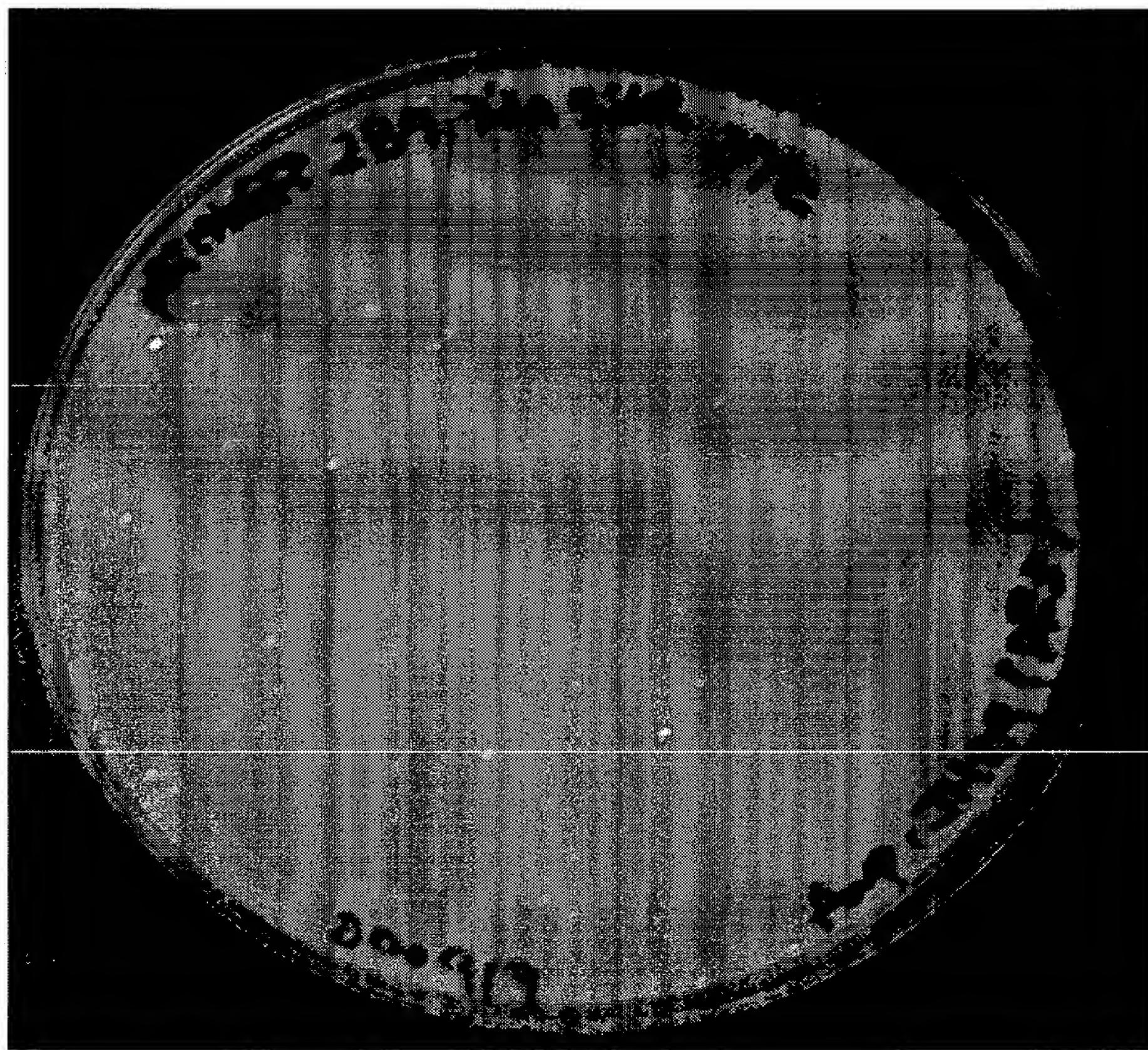
Target DNAの制限酵素サイト検索

Trial	OK	2enz change	No enz.	O: 2sides deletion	△: 1 side deletion												X: no deletion																				
					General	P-P	PCR成	R_SUP	PstI	EcoR	SmaI	KpnI	SpeI	NheI	3'	3'Nsi	5'Cla	5'Ks	EcoR	SphI	I	I	el	V	NruI	Pml	StuI	SacII	NarI	HndIII	NotI	XbaI					
					ID	MW [Da]	功度	R.T2	2	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###						
	X	14 1B2	76		ZX00001G13A	10740	3 498.9	411		214	###	###	###	###	###	###	###	292	###	###	###	###	###	###	###	41	###	###	###	###	###						
	△	161 2F5	70		ZX00003K23A	16300	3 157.8	94.87		238	1	###	###	###	###	###	###	###	600	###	###	###	###	###	###	###	19	###	###	###	###	###					
	X	2 1A2	66		ZX00001E07A	17121	3 360.9	245.8		1331	587	1071	###	208	###	1638	###	###	###	###	25	###	###	###	###	###	###	###	###	###	###	662					
	X	86 1H12	36		ZX00002H05A	17206	3 187.8	152.3		310	###	###	###	###	###	###	###	662	###	###	###	###	###	###	###	1309	###	###	###	###	894						
	△	116 2B8	1		ZX00003M12A	20930	3 325.1	119.3		258	###	###	###	###	###	###	###	662	###	###	###	###	###	###	###	41	###	###	###	###	662						
	X	70 1F10	38		ZX00002K10A	22088	3 534.1	96.9		1404	###	###	###	###	###	###	###	662	###	###	###	###	###	###	###	1309	###	###	###	###	894						
	X	38 1D2	59		ZX00001I07A	25649	3 424	303.1		53	###	###	###	###	###	###	###	662	###	###	###	###	###	###	###	41	###	###	###	###	662						
	O/A	144 2D12	64		ZX00003L10A	29655	3 440.2	129.5		7	###	###	###	###	###	###	###	496	###	###	###	###	###	###	###	915	###	###	###	###	915						
000201	O	56 1E8	48		ZX00002E09A	32885	3 215.6	202.8		326	###	###	###	###	###	###	###	662	###	###	###	###	###	###	###	1309	###	###	###	###	894						
	O/A	46 1D10	40		ZX00002G14A	33400	3 366.7	131.6		706	###	452	###	###	###	###	###	662	###	###	###	###	###	###	###	1309	###	###	###	###	894						
	O	187 2H7	23		ZX00003M04A	35674	3 288	216.5		38197	3 25.68	18.69		398	###	###	###	302	###	###	1295	###	###	###	###	###	###	###	1295	###	###	###	###	1295			
	O/A	191 2H11	62		ZX00003H22A	39197	3 133.1	133.1		635	###	###	###	###	###	###	###	635	###	###	###	###	###	###	###	57	###	###	###	###	57						
	O	122 2C3	29		ZX00002L05A	39709	3 133.1	133.1		222	###	25	1472	###	###	###	288	909	1725	###	1177	###	###	###	###	###	###	1177	###	###	###	###	1177				
000201	O	184 2H4	72		ZX00003G09A	42083	3 57.88	50.12		602	###	172	687	###	###	###	20	703	403	###	703	1303	###	###	###	###	###	###	537	###	###	###	###	537			
000201	O	192 2H12	71		ZX00003P02A	43663	3 236.9	51.23		144	###	10	72	###	###	###	144	70	1173	###	937	###	###	###	###	###	###	117	###	###	###	###	117				
	O	173 2C5	54		ZX00001M07A	44603	3 14.03	13.4		144	###	10	72	###	###	###	144	50	525	###	525	1421	###	###	###	###	###	###	1014	###	###	###	###	1014			
	O/A	118 2B11	42		ZX00003N21A	47702	3 134.5	87.5		144	###	10	72	###	###	###	144	99	99	###	99	1075	###	###	###	###	###	###	1450	###	###	###	###	812			
000201	O	73 1G1	21		ZX00001C13A	48119	3 390.1	320.1		144	###	10	72	###	###	###	144	635	659	###	635	1221	###	###	###	###	###	###	635	###	###	###	###	635			
	O	62 1F2	7		ZX00001K09A	50438	3 303.9	197.9		144	###	10	72	###	###	###	144	725	725	###	725	1221	###	###	###	###	###	###	537	###	###	###	###	537			
	O	181 2H1	27		ZX00002P05A	52085	3 26.74	23.77		144	###	10	72	###	###	###	144	76	79	76	76	336	###	###	###	###	###	###	679	###	###	###	###	679			
	O/A	143 2D11	77		ZX00003P02A	52500	3 152.4	19.1		144	###	10	72	###	###	###	144	140	612	89	951	579	###	###	###	###	###	###	932	###	###	###	###	932			
	O/A	75 1G3	32		ZX00001C08A	54264	3 440.2	384.4		144	###	10	72	###	###	###	144	1391	70	1173	###	941	579	###	###	###	###	###	###	1970	###	###	###	###	1970		
	O/A	77 1A7	40		ZX00001F14A	56943	3 482.1	77.87		144	###	10	72	###	###	###	144	1391	70	1173	###	941	579	###	###	###	###	###	###	1076	###	###	###	###	1076		
	O	166 2F10	24		ZX00003L13A	61309	3 111.2	96.59		144	###	10	72	###	###	###	144	50	525	290	270	97	1421	###	###	###	###	###	###	978	###	###	###	###	978		
	O	111 2B3	74		ZX00002J24A	64790	3 29	14.35		144	###	10	72	###	###	###	144	696	1059	99	56	583	1140	###	###	###	###	###	###	1322	###	###	###	###	1322		
000201	O	133 2D1	9		ZX00002J21A	66572	3 67.46	46.15		2165	2676	###	###	1829	###	###	144	2165	2676	1829	###	1735	583	###	2232	###	###	###	###	###	###	1927	###	###	###	###	1927
	O	76 1B4	6		ZX00001B03A	69																															

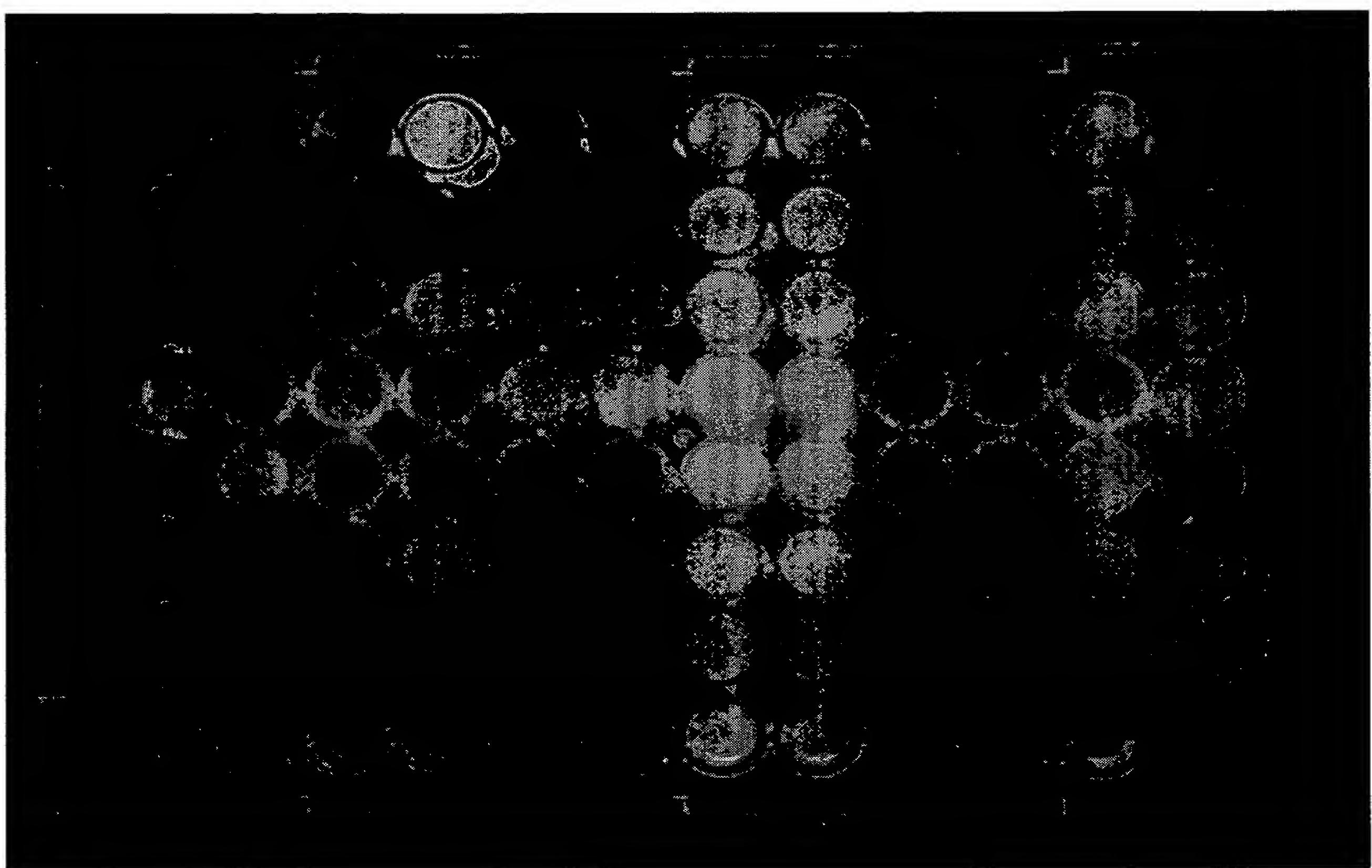
作成したDeletion Library



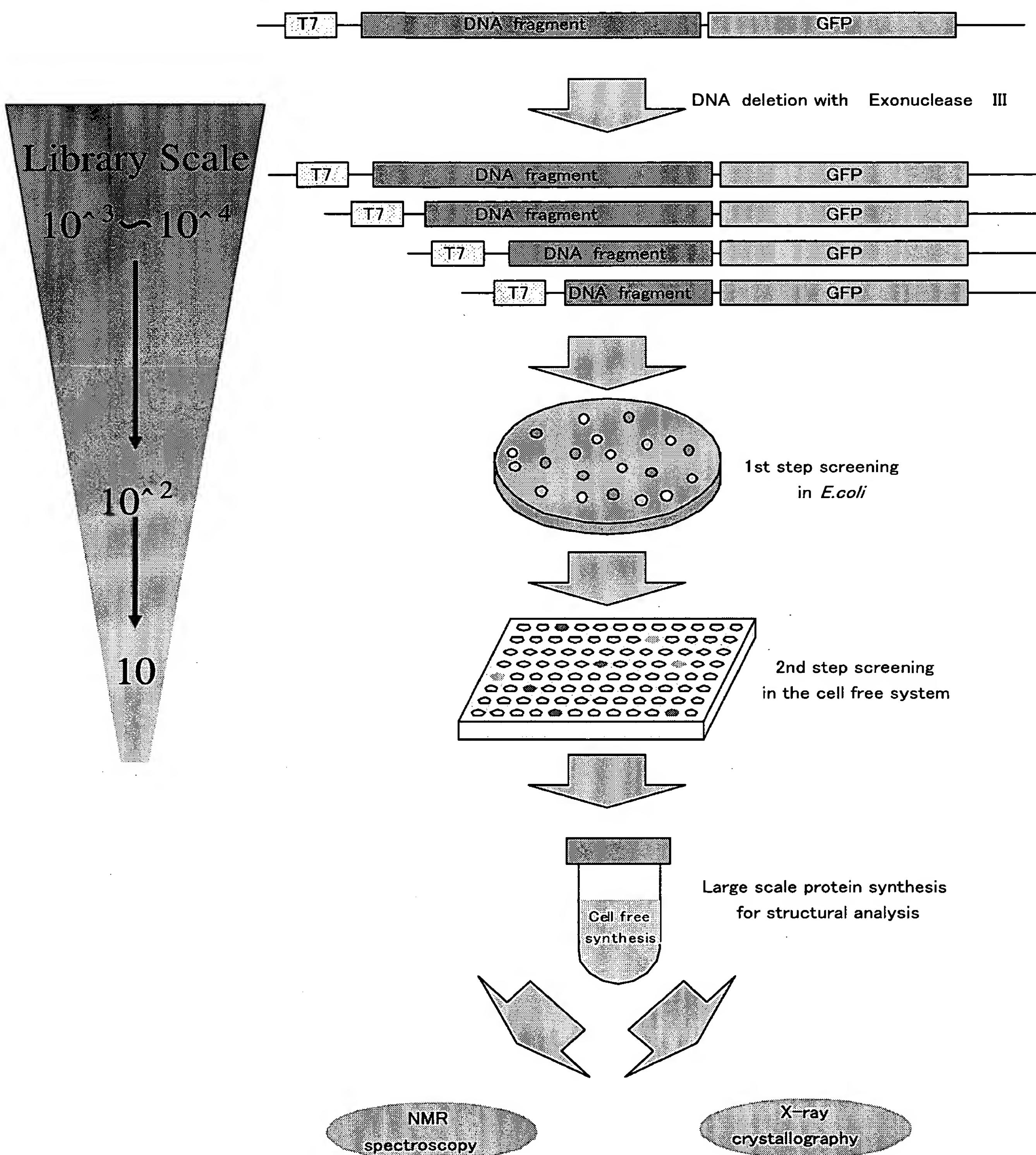
大腸菌での1段階目スクリーニング



無細胞合成での
2段階目スクリーニング



タンパク質ドメインの スクリーニングシステムの流れ

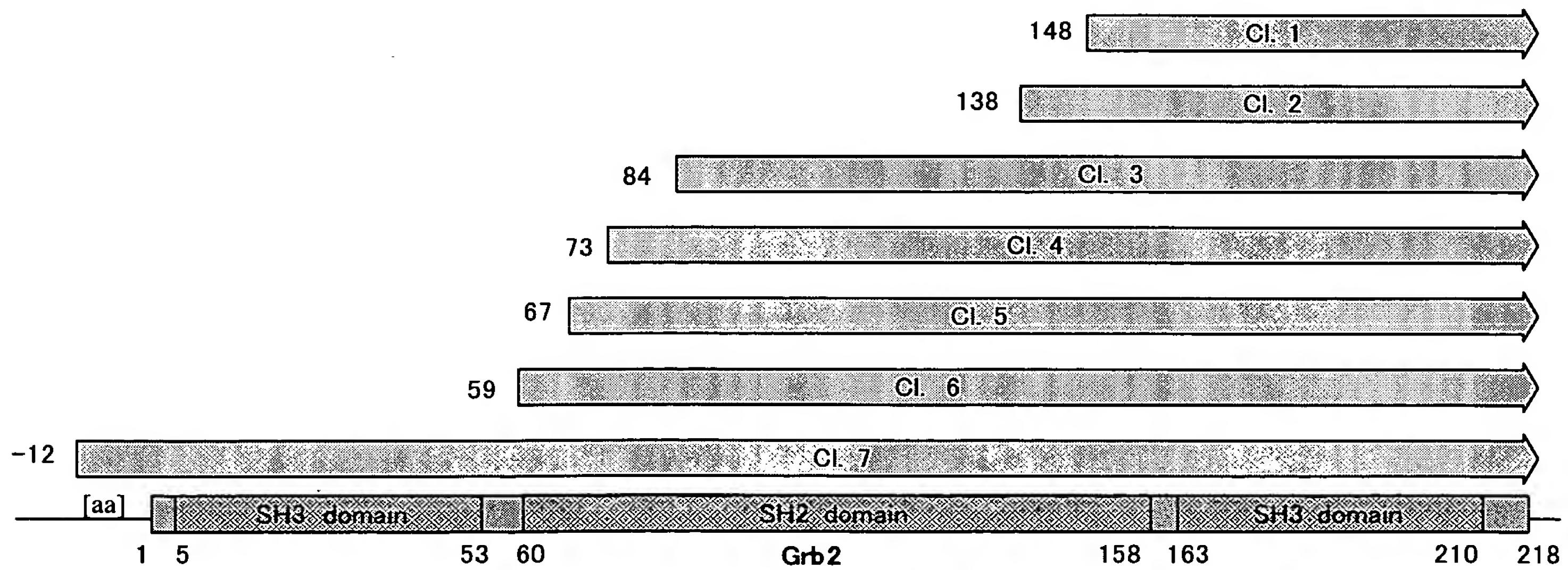


Grb2のドメインスクリーニング

- Grb2

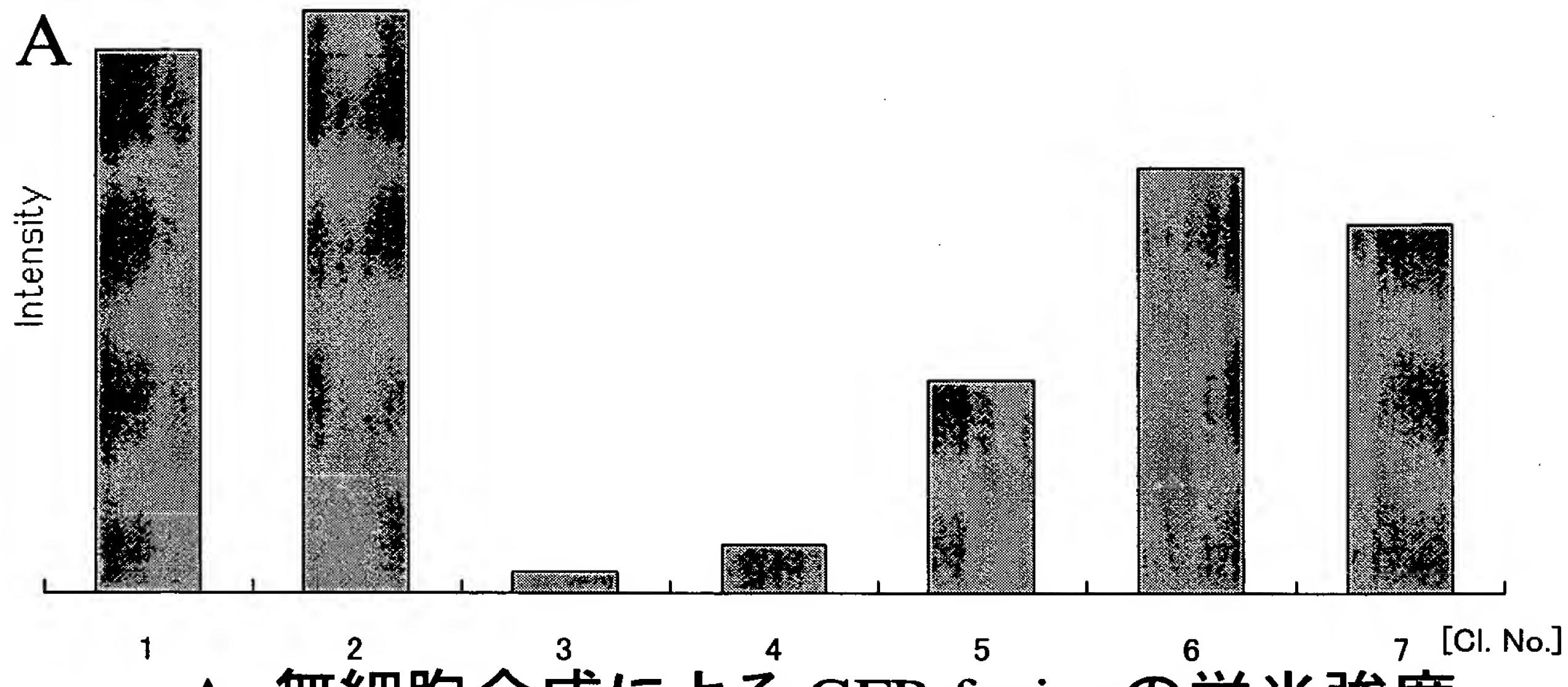
- 全長で可溶性 GFP-fusionは発光
- SH3, SH2, SH3ドメインを含む
- 立体構造がすでに解析されている
(Maignan, S. et. Al. Science 268, 291-293 1995)

スクリーニングにより選択された Deleted cloneの位置

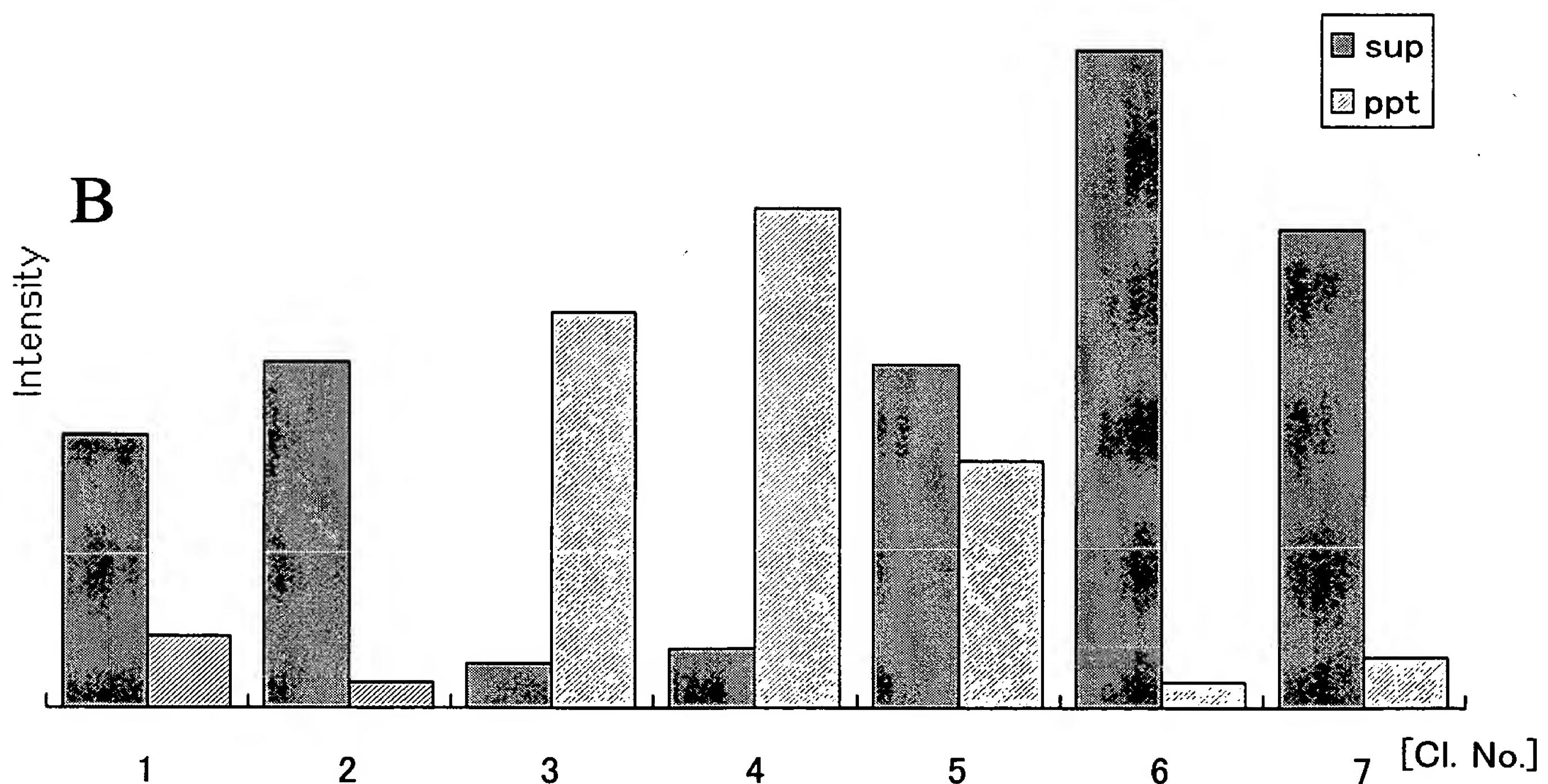


*ここでのドメインはアミノ酸配列の保存性から導き出された位置を示している

Grb2のDeleted cloneの解析(1)



A 無細胞合成による GFP-fusion の蛍光強度
(励起 485nm 発光 535nm)



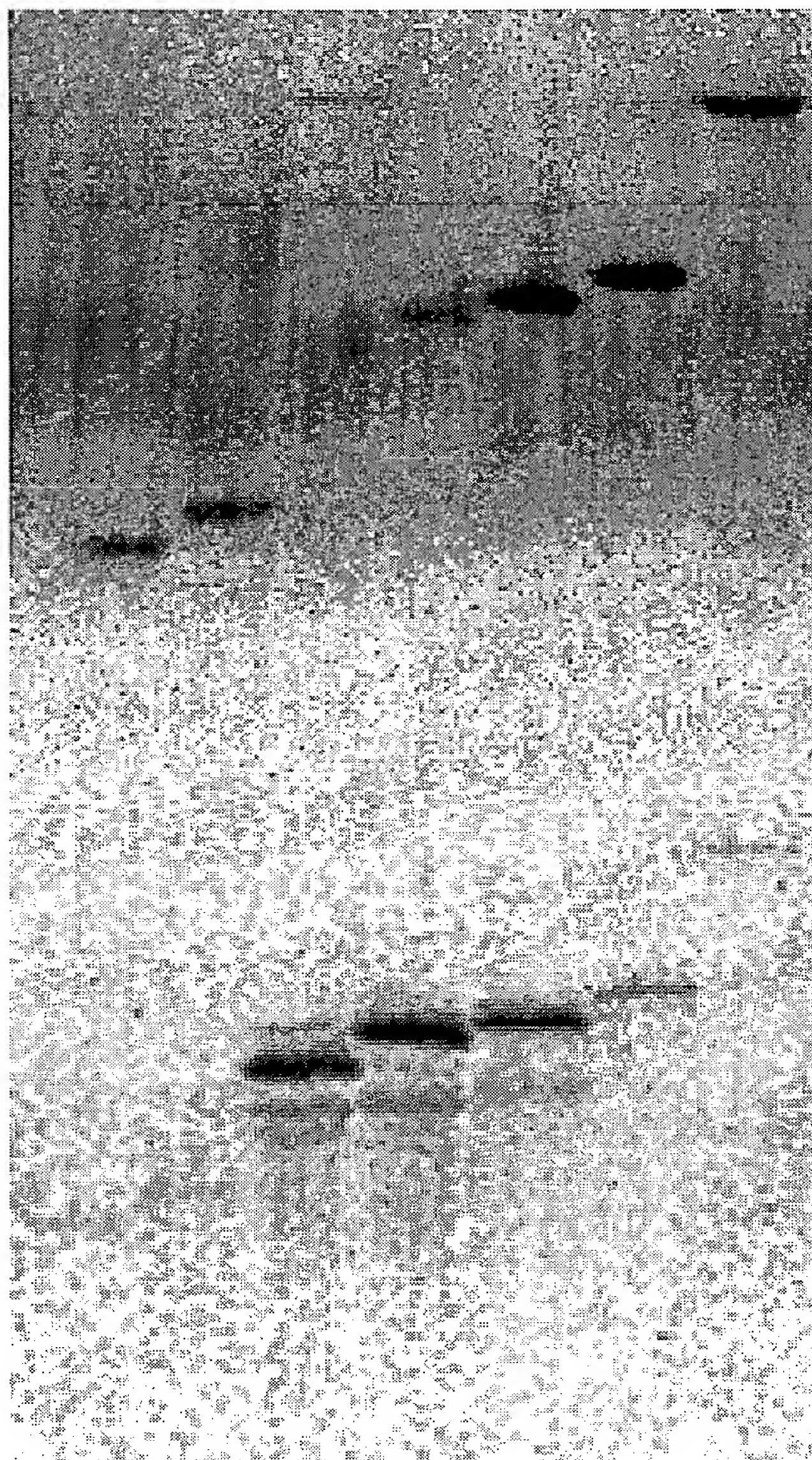
B 無細胞合成による単体での可溶性
(^{14}C , scintillation counter)

Grb2のDeleted cloneの解析(2)

C

1 2 3 4 5 6 7

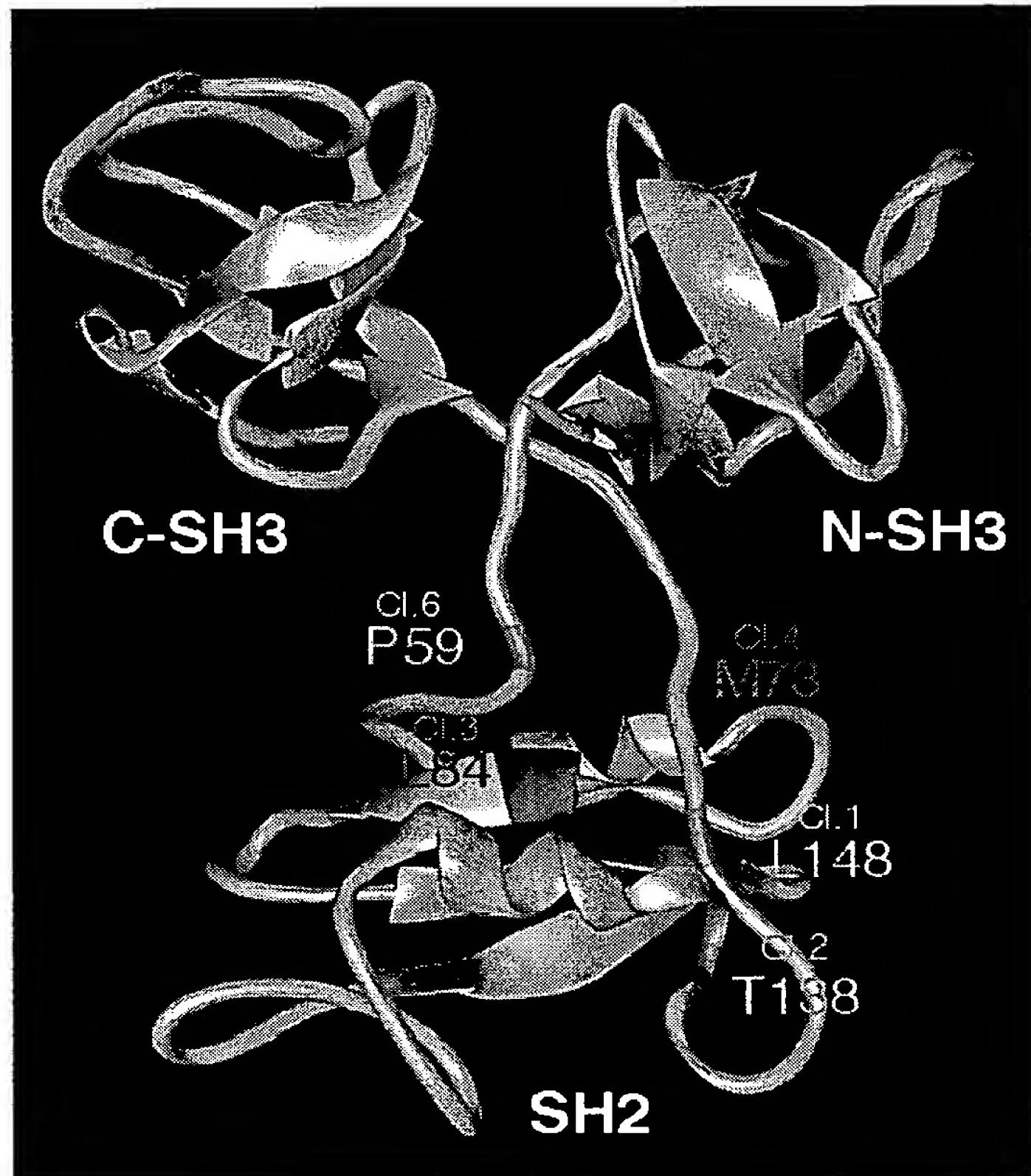
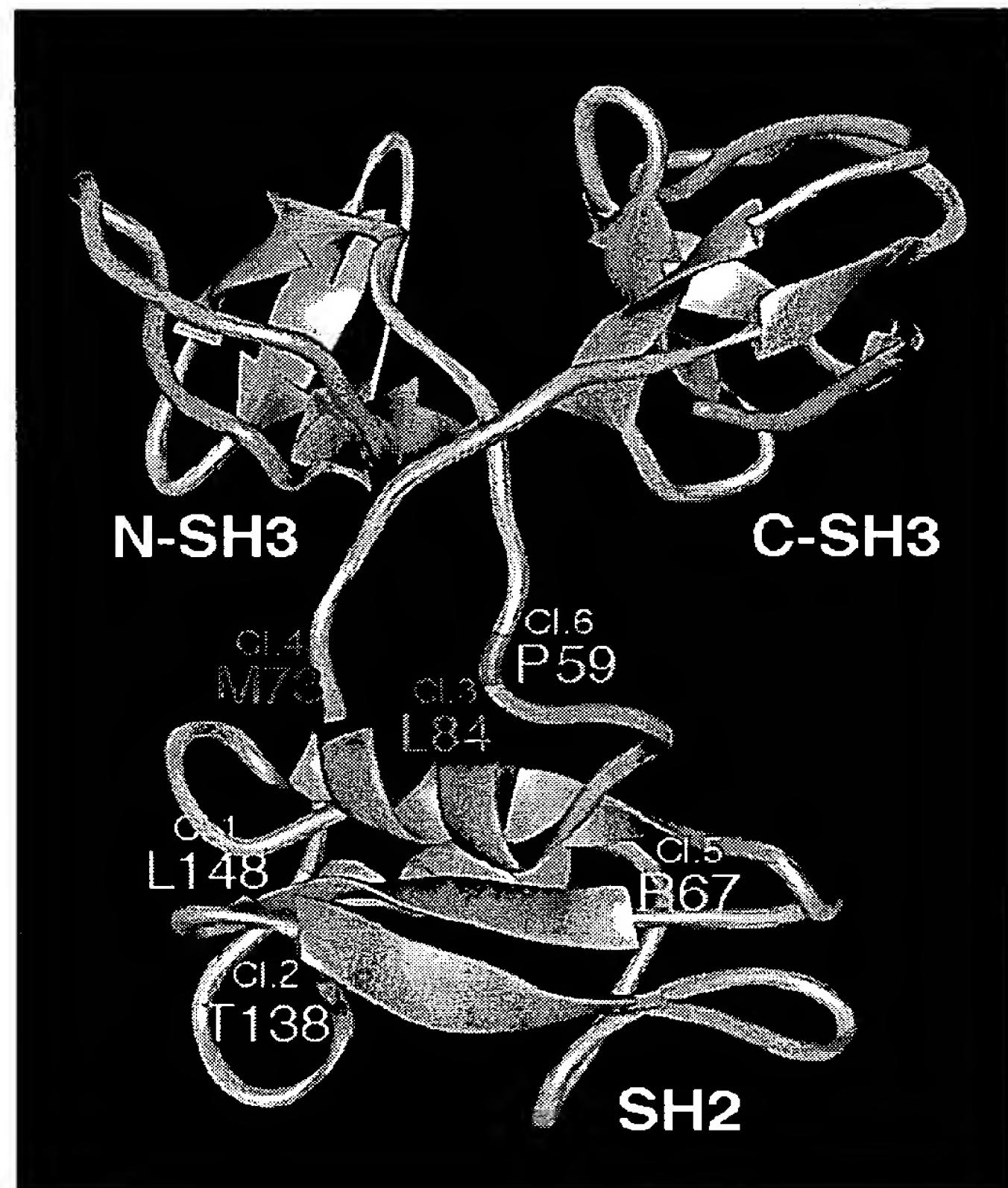
sup.



ppt.

C. 無細胞合成による単体のSDS-PAGE
(¹⁴C,MacBas)

立体構造とDeletion部位の比較



■ : Soluble

■ : Partially soluble

■ : Insoluble

結論

- Exonuclease IIIを用いることで、均一でサンプリング範囲の広いDNA randomly deleted library を作成することが可能になった。
- DNA deleted libraryとタンパク質C末端側でのGFP-fusionを組み合わせ、さらに、大腸菌と無細胞系を用いて2段階でスクリーニングすることにより、可溶性の高いドメインを、効率よく選び出すことが可能になった。
- Grb2においては、本系が導き出した可溶性の高いfragmentの境界と、立体構造上のドメイン境界との間に強い相関があった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.